

Diseño de una matriz de soporte compuesta de colágeno de piel de tiburón-aloe para ingeniería tisular

Design of shark skin collagen-aloe composite scaffold for tissue engineering

SHANMUGANATHAN S^{*1, 2}, SHANMUGASUNDARAM N³, ADHIRAJAN N¹, RAMYAA LAKSHMI TS¹, BABU M¹

¹ Biomaterials Division, Central Leather Research Institute, TICEL Biopark, Taramani Road, Taramani, Chennai – 600 113, Tamil Nadu, India.

² Department of Pharmaceutics, Sankaralingam Bhuvaneshwari College of Pharmacy, Sivakasi - 626130, Tamil Nadu, India.

³ US Army Institute of Surgical Research, Texas, USA

*Autor de contacto: S.Shanmuganathan. Department of Pharmaceutics, Sankaralingam Bhuvaneshwari College of Pharmacy, Sivakasi - 626130, Tamil Nadu, India. Teléfono: 91 (4562) 231619

Dirección de correo electrónico: shanmugganathan@yahoo.com

RESUMEN

Se ha demostrado que el colágeno es un nuevo biomaterial utilizado para la administración de fármacos, la fabricación de apósitos o como sustrato para ingeniería tisular cuya biocompatibilidad y propiedades biodegradables son únicas. El colágeno bovino y porcino tipo I constituyen una fuente fácilmente disponible de material de soporte para diversas aplicaciones biomédicas. Sin embargo, estas fuentes conllevan cierto riesgo potencial de enfermedades infecciosas como la encefalopatía espongiforme bovina o la encefalopatía espongiforme transmisible. Por esta razón, existe una demanda de colágeno tipo I procedente de otras fuentes. En el presente estudio, se utilizan animales acuáticos y, en concreto, especies de tiburón en las que el colágeno tipo I es una proteína principal de la piel y la estructura tiene similitud con la de las especies mamíferas. Se ha intentado utilizar colágeno de piel de tiburón como matriz de soporte con extracto de aloe para mejorar la estabilidad. Estas matrices de soporte se caracterizaron por varias propiedades fisicoquímicas y por la evaluación de biocompatibilidad para facilitar el crecimiento de fibroblastos dérmicos humanos *in vitro*. La incorporación de extracto de aloe influyó enormemente en la morfología y las propiedades fisicoquímicas de la matriz de soporte. Se observó *in vitro* que los fibroblastos conservaban la orientación organizada en forma de huso al cultivarse sobre la matriz de soporte de colágeno. Así, la matriz de soporte de colágeno desarrollada con una proporción de 10:1 de colágeno de piel de tiburón y extracto de aloe, respectivamente, sirvió como material biocompatible con una resistencia a la tracción apreciable. La investigación anterior sugiere que la matriz de soporte de colágeno de piel de tiburón desarrollada puede ser una alternativa efectiva al colágeno de mamífero en el campo de la ingeniería tisular y para diversas aplicaciones en la curación de heridas.

PALABRAS CLAVE: Colágeno. Matriz de soporte. Biocompatibilidad. Glucosaminoglucano. Aloe vera.

ABSTRACT

Collagen has proven to be a novel biomaterial used for drug delivery, wound cover dressings or as a substrate for tissue engineering with unique biocompatibility and biodegradable properties. Bovine and porcine Type I collagen provide a readily available source of scaffold material for various biomedical applications. However these sources have some potential risk of infectious diseases such as bovine spongiform encephalopathy or transmissible spongiform encephalopathy. Hence there is demand for an alternative Type I collagen from various other sources. The present study utilizes the aquatic animals particularly the shark species in which collagen Type I is a major protein in the skin and the structure has similarity to that of mammalian species. An attempt was made to use shark skin collagen as scaffold with the extract of aloe to improve the stability. These scaffolds were characterized for various physicochemical properties and biocompatibility assessment to support the growth of human dermal fibroblasts *in vitro*. The incorporation of aloe

Report Documentation Page				Form Approved OMB No. 0704-0188	
Public reporting burden for the collection of information is estimated to average 1 hour per response, including the time for reviewing instructions, searching existing data sources, gathering and maintaining the data needed, and completing and reviewing the collection of information. Send comments regarding this burden estimate or any other aspect of this collection of information, including suggestions for reducing this burden, to Washington Headquarters Services, Directorate for Information Operations and Reports, 1215 Jefferson Davis Highway, Suite 1204, Arlington VA 22202-4302. Respondents should be aware that notwithstanding any other provision of law, no person shall be subject to a penalty for failing to comply with a collection of information if it does not display a currently valid OMB control number.					
1. REPORT DATE 01 APR 2008		2. REPORT TYPE N/A		3. DATES COVERED -	
4. TITLE AND SUBTITLE Design of shark skin collagen-aloe composite scaffold for tissue engineering.				5a. CONTRACT NUMBER	
				5b. GRANT NUMBER	
				5c. PROGRAM ELEMENT NUMBER	
6. AUTHOR(S) Shanmuganathan S., Shanmugasundaram N., Adhirajan N., Ramyaa Lakshmi T. S., Babu M.,				5d. PROJECT NUMBER	
				5e. TASK NUMBER	
				5f. WORK UNIT NUMBER	
7. PERFORMING ORGANIZATION NAME(S) AND ADDRESS(ES) United States Army Institute of Surgical Research, JBSA Fort Sam Houston, TX 78234				8. PERFORMING ORGANIZATION REPORT NUMBER	
9. SPONSORING/MONITORING AGENCY NAME(S) AND ADDRESS(ES)				10. SPONSOR/MONITOR'S ACRONYM(S)	
				11. SPONSOR/MONITOR'S REPORT NUMBER(S)	
12. DISTRIBUTION/AVAILABILITY STATEMENT Approved for public release, distribution unlimited					
13. SUPPLEMENTARY NOTES					
14. ABSTRACT					
15. SUBJECT TERMS					
16. SECURITY CLASSIFICATION OF:			17. LIMITATION OF ABSTRACT UU	18. NUMBER OF PAGES 20	19a. NAME OF RESPONSIBLE PERSON
a. REPORT unclassified	b. ABSTRACT unclassified	c. THIS PAGE unclassified			

extract highly influenced the morphology and physicochemical properties of the scaffold. It was observed in vitro that the fibroblasts retained the spindle shape, organized orientation when cultured over collagen scaffold. Thus the developed collagen scaffold at 10: 1 ratio of shark skin collagen and aloe extract respectively served as a biocompatible material with appreciable tensile strength. The above investigation suggests that the developed shark skin collagen scaffold could be an effective alternative for the mammalian collagen for tissue engineering and various wound healing applications.

KEY WORDS: Collagen. Scaffold. Biocompatibility. Glycosaminoglycan. Aloe vera.

Fecha de recepción: 13-01-2009

Fecha aceptación: 03-02-2009

INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que el colágeno es una materia prima sumamente nueva, valiosa que se utiliza comúnmente para diversas aplicaciones como la administración de fármacos, la fabricación de apósitos para heridas o quemaduras¹ o como sustrato para ingeniería tisular² cuya biocompatibilidad y propiedades biodegradables son únicas. Como es sabido, el colágeno, la proteína más abundante en los animales, proporciona la mayoría del soporte estructural y mecánico a tejidos y órganos³. Se han identificado⁴ más de 20 tipos de colágeno y, de todos ellos, el colágeno tipo I es el principal componente del tejido conectivo de los mamíferos, suponiendo el 30% de todas las proteínas presentes en el cuerpo humano⁵.

El colágeno tipo I procedente de piel bovina y porcina se utiliza ampliamente para diversas aplicaciones biomédicas. Debido al riesgo potencial que estas fuentes conllevan de enfermedades como la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) o la encefalopatía espongiforme transmisible (EET), existe una gran demanda de colágeno tipo I procedente de otras fuentes. La alternativa potencial puede estar en los animales acuáticos y, en concreto, en las especies de tiburón. El tiburón se captura en la zona costera de India y se procesa para su consumo como alimento; por lo que una gran cantidad de piel fresca se genera como subproducto. La piel del tiburón, que constituye alrededor del 11% del peso corporal del animal, se desecha en su mayor parte como residuo industrial, a excepción de la parte destinada para su uso como cuero. La principal proteína de la piel de tiburón es el colágeno tipo I, cuya estructura se asemeja básicamente a la de los animales domésticos y tiene igualmente la habilidad de unirse para formar fibrillas como las del colágeno tipo I de los mamíferos. Sin embargo, el contenido de iminoácidos y la naturaleza de los enlaces cruzados varían con respecto

INTRODUCTION

Collagen has proven to be an extremely novel, valuable and commonly used raw material for a variety of applications including drug delivery, burn or wound cover dressings¹ or as a substrate for tissue engineering² with unique biocompatibility and biodegradable properties. Collagen the most abundant protein in animals is known to provide the majority of the structural and mechanical support to tissues and organs³. Over 20 types of collagen have been identified⁴ and among these the type I collagen is the major component of mammalian connective tissue, accounting 30% of all protein in the human body⁵.

Type I collagen from bovine and porcine skin are extensively utilized for various biomedical applications. Due to the potential risk of bovine spongiform encephalopathy (BSE) or transmissible spongiform encephalopathy (TSE) from these sources the demand for type I collagen from other sources is greatly realized. The potential alternative could be the aquatic animals particularly the shark species. Shark is collected in the Indian coastal area and processed for food; hence a lot of fresh skin is generated as a byproduct. Shark skin, which constitutes about 11% of the animals body weight, is mainly discarded as industrial waste, except for its use as leather. The main protein in shark skin is type I collagen, the structure basically resembles that from domestic animals and also has the ability of self assembly to form fibrils as that of mammalian type I collagen⁶. However the content of imino acids and the nature of cross-linkages vary from mammalian collagen, which is reflected in the low denaturation temperature of shark skin collagen.

Nevertheless various methods such as chemical crosslinking such as glutaraldehyde, formaldehyde and isocyanate confer remarkably high strength and durability but also induce potential cytotoxicity or poor biocompatibility. Incorporation and

al colágeno de los mamíferos, lo que se refleja en la baja temperatura de desnaturalización del colágeno de la piel de tiburón.

No obstante, diversos métodos como reticulantes químicos tales como glutaraldehído, formaldehído e isocianato confieren una durabilidad y resistencia notablemente altas, pero también conllevan una potencial citotoxicidad o una baja biocompatibilidad. La incorporación y/o reticulación con análogos de los glucosaminoglucanos (GAG) es uno de los enfoques habituales cuando se considera la regeneración de la piel en la curación de heridas dérmicas profundas. GAG, componente de la matriz extracelular (MEC) nativa, proporciona integridad estructural, así como estabilidad mecánica y enzimática a las moléculas de colágeno. Colágeno y GAG, componentes idénticos de los tejidos originales, se utilizan ampliamente para fabricar matrices de soporte que sirvan como análogos activos de la MEC original. La combinación de colágeno y GAG es exclusiva de la regeneración de la piel dado que el colágeno o el GAG por sí solo no puede curar heridas de grosor completo^{7, 8}.

El aloe (*Aloe barbadensis* Miller) es una planta grasa perenne perteneciente a la familia de las Liliáceas. El aloe constituye una fuente rica en polisacáridos y tiene diversos componentes carbohidratados como, por ejemplo, polisacáridos, acemanán y manosa-6-fosfato, de los que manosa-6-fosfato y mananos acetilados (acemanán) son los principales componentes de los carbohidratos del aloe⁹. Numerosas actividades biológicas, entre las que se incluyen la antiviral, antibacteriana, laxante, de protección frente a la radiación, antiinflamatoria e inmunoestimuladora se han atribuido a esta planta y, en concreto, a sus polisacáridos. Grey¹⁰ sugirió que la manosa-6-fosfato unida a una proteína tiene un efecto incluso mayor en la curación de heridas. Actualmente, la planta se utiliza principalmente en las áreas de cuidado de la piel, cosmética y curación de heridas.

En la presente investigación, hemos utilizado la naturaleza inherente del colágeno de la piel del tiburón lechoso para formar agregados de microfibrillas primarias utilizando extractos de hoja de Aloe vera en los inter e intraenlaces cruzados a una temperatura y pH óptimos, dando lugar a fibrillas de colágeno más grandes, para el desarrollo de finas películas/matrices de soporte. Se realizó la caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido

or crosslinking with glycosaminoglycans (GAG) analogs are one of the positive approaches when skin regeneration in deep dermal wound healing is considered. GAG the constituent of the native extra cellular matrix (ECM) imparts structural integrity, mechanical and enzymatic stability to the collagen molecules. Collagen and GAG, identical constituents of native tissues, are widely utilized to fabricate scaffolds serving as active analogs of native ECM. The combination of collagen and GAG is unique in skin regeneration since collagen or GAG alone cannot heal full thickness wounds^{7, 8}.

Aloe (*Aloe barbadensis* Miller) is a perennial succulent plant belonging to the Liliaceae family. Aloe is a rich source of polysaccharides and has various carbohydrate constituents, for example, polysaccharides, acemannan, and mannose-6-phosphate, of which mannose-6-phosphate and acetylated mannans (acemannan) are major constituents of the carbohydrates of Aloe⁹. Many biological activities, including antiviral, antibacterial, laxative, protection against radiation, anti-inflammation and immunostimulation have been attributed to this plant, in particular, its polysaccharides. Grey¹⁰ suggested that mannose-6-phosphate linked to a protein produces even greater wound-healing effects. Currently, the plant is most widely used in areas of skin care, cosmetics and wound healing.

In the present investigation we have utilized the inherent nature of milk shark skin collagen to form primary micro fibril aggregates using Aloe vera leaf extracts through inter- and intra-cross-linking at optimum pH and temperature, resulting in larger collagen fibrils, to be developed into thin films/ scaffolds. Morphological characterization through Scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM) and light microscopy (LM) were carried out and the physicochemical properties especially functional, thermodynamic and tensile strength were assessed. Apart from its basic biochemical properties, the scaffold was assessed for its biocompatibility through its ability to support in vitro fibroblast attachment and growth.

(SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía óptica (LM) y se evaluaron las propiedades fisicoquímicas, especialmente, funcionales, termodinámicas y la resistencia a la tracción. Además de las propiedades bioquímicas básicas, se evaluó la matriz de soporte para determinar su biocompatibilidad a través de su capacidad para favorecer la unión y crecimiento de fibroblastos *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material

El tiburón lechoso (*Rhizoprionodon acutus*) se capturó en la costa local y se procedió a retirarle la piel externa, que se cortó en pequeños trozos y se congeló a -70°C hasta su uso. Medio de cultivo

Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suero fetal bovino (FCS), bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), colagenasa (cruda Tipo 1A), L-glutamina, estreptomicina, penicilina, gentamicina y fungizona se obtuvieron en Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). El resto de productos químicos utilizados en el presente estudio son de grado analítico.

Extracción del colágeno de la piel de tiburón

La extracción del colágeno de la piel de tiburón se realizó de acuerdo con el procedimiento de Nagai¹¹ con ligeras modificaciones. Todos los procedimientos de preparación se realizaron a 4°C . Los fragmentos de piel se trataron con acetato sódico de 0,5 M, agitándose ocasionalmente para eliminar las proteínas no colagenosas, y se lavaron con agua destilada. A continuación, la piel se trató con alcohol butílico al 10% para retirar la grasa y posteriormente se lavó bien con agua destilada fría. La piel se homogeneizó a continuación en ácido acético 0,5 M y se extrajo con ácido acético 0,5 M durante 3 días. El extracto se centrifugó a $20.000 \times g$ durante 1 hora y el residuo se volvió a extraer con la misma disolución durante 2 días y, a continuación, se centrifugó. Ambos extractos se mezclaron y se salaron añadiendo cloruro sódico hasta obtener una concentración final 0,9 M. El precipitado resultante se obtuvo mediante centrifugación a $20.000 \times g$ durante

MATERIALS AND METHODS

Materials

Milk shark (*Rhizoprionodon acutus*) was collected from the local coast and the outer skin was removed, cut into small pieces and frozen at -70°C until used. Dulbecco's

Modified Eagles Medium (DMEM), Fetal calf serum (FCS), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Collagenase (crude Type 1A), L-glutamine, Streptomycin, Penicillin, Gentamycin, Fungizone were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other chemicals used in this work are of analytical grade.

Extraction of collagen from shark skin

Collagen extraction from shark skin was carried out according to the procedure of Nagai¹¹ with slight modification. All the preparative procedures were performed at 4°C . The skin pieces were treated with 0.5 M sodium acetate with occasional shaking to remove non-collagenous proteins and washed with distilled water. The skin was then treated with 10% butyl alcohol to remove fat and then washed extensively with cold distilled water. The skin was then homogenized in 0.5 M acetic acid and extracted with 0.5 M acetic acid for 3 days. The extract was centrifuged at $20,000 \times g$ for 1 h and the residue was re extracted with the same solution for 2 days and then centrifuged. Both the extracts were mixed and salted out by adding sodium chloride to a final concentration of 0.9M. The resultant precipitate was collected by centrifugation at $20,000 \times g$ for 1 h and dissolved in 0.5 M acetic acid, dialyzed against 0.1M acetic acid, and distilled water and then lyophilized to get acid solubilised collagen (ASC).

The residue left after acetic acid extraction was suspended in 0.5M acetic acid and was digested with 1% w/v of pepsin at 4°C for 18 h. The pepsin solubilised collagen was centrifuged at $20,000 \times g$ for 1h and to the supernatant sodium chloride to a final concentration of 0.9M was added to precipitate the collagen. The resultant precipitate was collected by centrifugation at $20,000 \times g$ for 1 h and dissolved in 0.5M acetic acid, dialyzed against 0.1M acetic acid, and distilled water and then lyophilized to get pepsin solubilised collagen

1 hora y se disolvió en ácido acético 0,5 M, se dializó frente a ácido acético 0,1 M y agua destilada y, finalmente, se liofilizó para obtener colágeno soluble en ácido (ASC).

El residuo resultante tras la extracción con ácido acético se suspendió en ácido acético 0,5 M y se digirió con pepsina al 1% p/v a 4° C durante 18 horas. A continuación, el colágeno soluble en pepsina se centrifugó a 20.000 x g durante 1 hora y se añadió cloruro sódico al sobrenadante hasta obtener una concentración final 0,9 M para precipitar el colágeno. El precipitado resultante se obtuvo mediante centrifugación a 20.000 x g durante 1 hora y se disolvió en ácido acético 0,5 M, se dializó frente a ácido acético 0,1 M y agua destilada y, finalmente, se liofilizó para obtener colágeno soluble en pepsina (PSC). La organización molecular del colágeno se evaluó mediante SDS – PAGE y se determinó el contenido de colágeno por el método de Woessner basado en el índice de hidroxiprolina¹².

Formación de fibrillas

El colágeno se disolvió en ácido acético 0,05 M a 4° C hasta obtener una concentración aproximada de 1 mg/ml. La formación de fibrillas se inició mezclando un volumen igual de disolución de colágeno y tampón fisiológico (cloruro sódico y fosfato hasta una concentración final 0,13 M y 0,02 M, respectivamente e hidróxido de sodio para obtener un pH próximo a 7,0) e introduciendo 1 ml de disolución de colágeno en una célula con camisa de agua (paso de luz de 1 cm) a 30° C en un espectrofotómetro UV visible Perkin Elmer Lambda 45. La turbidez se registró de forma continua como la densidad óptica a 313 nm.

Desarrollo de matrices de soporte de colágeno reconstituido

Para el desarrollo de matrices de soporte de colágeno reconstituido, se utilizó colágeno soluble en pepsina debido a que rompe los extremos no helicoidales y reduce la inmunogenicidad considerablemente.

El desarrollo de la matriz de soporte de colágeno se inició con la formación de fibrillas usando 30 ml de colágeno (conteniendo 300 mg) preparado

(PSC). The molecular organization of collagen was assessed by SDS – PAGE and collagen content was determined based on the hydroxyproline index by the method of Woessner¹².

Fibril formation

Collagen was dissolved in 0.05M acetic acid at 4°C to give a concentration of about 1mg/ ml. Fibril formation was initiated by mixing equal volume of collagen solution and physiological buffer (sodium chloride and phosphate to a final concentration of 0.13M and 0.02M respectively, and sodium hydroxide to get a pH of near 7.0) and introducing 1 ml of collagen solution into a water jacketed cell (1cm light path) at 30°C in a Perkin Elmer Lambda 45 UV visible spectrophotometer. Turbidity was recorded continuously as the optical density at 313 nm.

Development of reconstituted collagen scaffolds

For the development of reconstituted collagen scaffolds pepsin soluble collagen was used because it cleaves the non-helical ends and reduces the immunogenicity considerably.

Collagen scaffold was developed by initiating fibril formation using 30 ml of collagen (containing 300 mg) prepared in 0.05M acetic acid with 2 ml of 0.2M phosphate buffer and 2M NaCl, while the pH was adjusted to its isoelectric point (6.9-7.2) using 1M NaOH¹³. After fibrillation the solution mixture was poured in a horizontal polypropylene platform (10x10x2 cm) and allowed to dry at 32°C until a thin film was obtained. The scaffolds were then washed 2-3 times with double distilled water, dried and desiccated for further experiments.

Aloe incorporated shark skin collagen scaffold

Full size mature leaves were cut from the plant and the rind was removed. The colorless parenchyma was ground in a blender and filtered. The filtrate was stored not more than 48 h at 4°C until use. The prepared extract was subjected to anthrone assay¹⁴ to determine the total polysaccharide content and incorporated during fibrillation

en ácido acético 0,05 M con 2 ml de tampón fosfato 0,2 M y NaCl 2 M, mientras que el pH se ajustó a su punto isoeléctrico (6,9-7,2) con NaOH 1 M¹³. Tras la formación de las fibrillas, la mezcla en disolución se vertió sobre una plataforma de polipropileno horizontal (10x10x2 cm) y se dejó secar a 32° C hasta obtener una fina película. A continuación, las matrices de soporte se lavaron 2-3 veces con agua bidestilada, se secaron y se desecaron para experimentos posteriores.

Incorporación de aloe a la matriz de soporte de colágeno de piel de tiburón

Se cortaron hojas maduras enteras de la planta y se retiró la corteza. El parénquima incoloro se trituró en una trituradora y se filtró. El filtrado se almacenó durante no más de 48 horas a 4° C hasta su uso. El extracto preparado se sometió al ensayo de antrona¹⁴ para determinar el contenido total de polisacáridos y se incorporó durante la formación de las fibrillas a diversas proporciones de 10:0,5, 10:1 y 10:2 p/p de colágeno y contenido equivalente de polisacáridos de aloe, respectivamente. Las disoluciones viscosas de colágeno soluble en pepsina (PSC) y de colágeno con aloe incorporado en proporciones de 10:0,5 (CA1), 10:1 (CA2) y 10:2 (CA3) se dispusieron sobre una plataforma de polipropileno horizontal de 10x10x2 cm y se incubaron a 30° C hasta que se obtuvieron matrices similares a membranas. A continuación, las matrices de soporte se lavaron tres veces con agua destilada, se secaron al aire por completo y se almacenaron en un desecador hasta su uso posterior.

Morfología de las matrices de soporte de colágeno

La morfología de la superficie fibrosa de la matriz de soporte de colágeno se evaluó mediante un microscopio LEICA DMIRB, Leica Wetzlar, Alemania. Las fibrillas interconectadas y su naturaleza porosa se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, imágenes obtenidas con un microscopio electrónico de barrido JEOL 8401, Tokio, Japón). Antes de realizar el barrido de las muestras, éstas se cubrieron de oro en vacío.

at various ratios of 10:0.5, 10:1 and 10:2 w/w of collagen and equivalent polysaccharide content of Aloe respectively. Viscous solutions of both pepsin soluble collagen (PSC) and Aloe incorporated collagen 10:0.5 (CA1), 10:1 (CA2) and 10:2 (CA3) were cast over a horizontally placed polypropylene platform of 10x10x2 cm and incubated at 30°C until membrane like scaffolds were obtained. The scaffolds were then washed thrice with distilled water and completely air dried and stored in a desiccator until further use.

Morphology of the collagen scaffolds

The bulk surface morphology of the collagen scaffold was assessed by LEICA DMIRB Microscope, Leica Wetzlar, Germany. The interconnecting fibrils and its porous nature was assessed by Scanning Electron Microscopy, (SEM pictures obtained using JEOL 8401 scanning electron microscope, Tokyo, Japan). Before the samples were scanned they were gold coated under vacuum.

Fourier transform infra red spectroscopy (FT-IR)

Samples before being subjected to FT-IR analysis were thoroughly washed in double distilled water, dried and desiccated completely. The scaffold was then analyzed using Perkin Elmer Fourier transform infrared spectrophotometer (Shelton, USA) in diffuse reflectance mode.

Differential scanning calorimetry (DSC)

Heat denaturation property of the collagen scaffold was analyzed using Differential Scanning Calorimeter (Netzsch-Geratebau GmbH thermal analyzer with DSC 200 PC). Calorimetric scanning was made between the temperature ranges of 0°C- 200°C at a uniform scanning rate of 5°C/min under the atmosphere of nitrogen.

Tensile strength analysis

The scaffolds were subjected to load-deformation analysis using Instron automated material

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Antes de realizar el análisis FT-IR, se lavaron exhaustivamente las muestras en agua bidestilada y, a continuación, se secaron y desecaron por completo. La matriz de soporte se analizó a continuación con un espectrofotómetro de infrarrojo por transformada de Fourier (Shelton, EE.UU.) en modo de reflectancia difusa.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La capacidad de desnaturalización por calor de la matriz de soporte de colágeno se analizó mediante un calorímetro diferencial de barrido (analizador térmico Netzsch-Geratebau GmbH con DSC 200 PC). El barrido calorimétrico se realizó dentro del intervalo de temperatura 0°C - 200°C a una velocidad de barrido uniforme de 5°C/min en atmósfera de nitrógeno.

Análisis de resistencia a la tracción

Las matrices de soporte se sometieron a análisis de carga-deformación mediante un sistema automatizado para prueba de material Instron 1.04 en modo de tensión uniaxial. Los experimentos se realizaron a una velocidad constante del travesaño de 5 mm/min con una humedad relativa del 60% a 25°C. Antes de someter las muestras a análisis, se procedió a secar en desecador muestras de las matrices de soporte en tiras con un ancho uniforme de 10 mm y un grosor aproximado de 0,1 mm.

Evaluación de la biocompatibilidad de la matriz de soporte de colágeno

La biocompatibilidad de la matriz de soporte de colágeno se evaluó a través de su capacidad para favorecer el crecimiento de fibroblastos de piel humana *in vitro*.

Cultivo in vitro de fibroblastos

Las biopsias de piel de pacientes sometidos a cirugía estética se trasladaron

testing system 1.04 in uniaxial tension mode. The experiments were carried out at a constant cross-head speed of 5 mm/min with relative humidity of 60% at 25°C. Before subjecting the sample to analysis, strip shaped samples of uniform width of 10 mm and thickness of around 0.1 mm of scaffolds were desiccator dried.

Assessment of biocompatibility of collagen scaffold

The biocompatibility of the collagen scaffold was assessed through its ability to support the *in vitro* growth of human skin fibroblasts.

In vitro culture of fibroblast

Skin biopsies collected from patients undergoing cosmetic surgery were brought

in sterile condition to the tissue culture laboratory (for dealing with human samples, the study was conducted in accordance to the guidelines of the ethical committee of Central Leather Research Institute [CLRI] and Kilpauk medical college hospital, Chennai). The tissue was washed with Phosphate Buffered Saline (PBS) with 10x antibiotics thrice and then twice with PBS-1x antibiotics and placed in 0.3% trypsin at 4°C overnight.

The next day epidermal and dermal layers were separated and the dermal portion was cut into small pieces digested with collagenase at 37°C and then transferred to the flask containing DMEM supplemented with 10% Fetal calf serum (FCS), 4mM L-glutamine, streptomycin (100 µg/ml), penicillin (100 U/ml), gentamycin (30 µg/ml), fungizone (2 µg/ml) and cultured in a humidified 5% CO₂/95% air atmosphere. After allowing the cultures to grow to confluence, experiments were carried out using early passages of cells (2-4 passage).

Cell viability on collagen scaffold

The collagen scaffolds were washed 2-3 times with distilled water, dried completely and sterilized under ethylene oxide atmosphere for 5 hours at relative humidity of 70%. After sterilization the scaffolds were aerated with sterile

en condiciones de esterilidad al laboratorio de cultivos tisulares (en lo que respecta al manejo de muestras humanas, el estudio se realizó de acuerdo con las directrices del comité de ética del Central Leather Research Institute [CLRI] y del Medical College Hospital de Kilpauk, Chennai). El tejido se lavó tres veces con tampón fosfato salino (PBS) con antibióticos 10x y, a continuación, dos veces con PBS-antibióticos 1x y se colocó en tripsina al 0,3% a 4° C durante la noche.

Al día siguiente, se separaron las capas epidérmica y dérmica y se cortó la parte dérmica en pequeños trozos digeridos con collagenasa a 37° C y, a continuación, se transfirió a un matraz que contenía DMEM suplementado con suero fetal bovino (FCS) al 10%, L-glutamina 4mM, estreptomicina (100 µg/ml), penicilina (100 U/ml), gentamicina (30 µg/ml), fungizona (2 µg/ml) y se cultivó en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y 95% de aire. Tras permitir que los cultivos crecieran hasta su confluencia, se realizaron experimentos utilizando los primeros pases de células (2-4 pases).

Viabilidad de las células en la matriz de soporte de colágeno

Las matrices de soporte de colágeno se lavaron 2-3 veces con agua destilada, se secaron por completo y se esterilizaron en una atmósfera de óxido de etileno durante 5 horas a una humedad relativa del 70%. Tras la esterilización, las matrices de soporte se airearon con una corriente de aire estéril a presión atmosférica durante 48 horas para eliminar por completo el óxido de etileno residual. Las matrices de soporte esterilizadas se cortaron en pequeños trozos (1x1 cm), se colocaron en una placa de 24 pocillos, se lavaron dos veces con PBS estéril y se dejó que secaran a 37° C en atmósfera estéril.

Los fibroblastos cultivados procedentes de un matraz de cultivo tisular de 25 cm² estándar se tripsinizaron (Greiner, Frickenhausen, Alemania) y se realizó un recuento con un hemocitómetro. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 3-5 minutos, se suspendieron de nuevo en medio fresco con FCS al 10%, se sembraron por la matriz de soporte (25.000 células / pocillo) y se incubaron a 37° C en una atmósfera de CO₂ / 95% de aire. La placa de cultivo sin matriz de

airflow at atmospheric pressure for 48 hours to remove residual ethylene oxide completely. The sterilized scaffolds were cut into small pieces (1x1cm), placed in a 24 well plate, washed twice with sterile PBS and allowed to dry at 37°C in sterile atmosphere.

Cultured fibroblasts from a standard 25cm² tissue culture flask was trypsinised (Greiner, Frickenhausen, Germany) and counted using a haemocytometer. The cells were centrifuged at 1000 rpm for 3-5 minutes, re-suspended in fresh medium with 10% FCS, seeded over the scaffold (25,000 cells / well) and incubated at 37°C, in CO₂ / 95% air atmosphere. The culture plate without scaffold was kept as control. The cell attachment and cellular morphology was observed under phase contrast microscope and cellular viability was assessed using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2yl)-2, 5- diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay at regular time intervals (24, 48 and 72 h).

At the end of the incubation period 50 µl of MTT aqueous solution (5 mg/ ml) as added to each well and incubated at 37°C for 4 h¹⁵. After removal of the supernatants, the purple formazan crystals formed were dissolved in 1 ml of dimethylsulfoxide and the absorbance was measured using spectrophotometer at 570 nm.

RESULTS

Extraction of collagen

The percentage extractability of the collagen from shark skin, based on the hydroxyproline index was found to be about 34 ±1% and 52 ±1% for ASC and PSC respectively on the basis of lyophilized dry weight with respect to wet weight of tissues. The SDS – PAGE pattern of ASC and PSC confirmed the presence of type I collagen with characteristic α1 [I] and α2 [I] chains (Figure 1).

sopORTE se mantuvo como control. La unión de las células y la morfología celular se observaron con un microscopio de contraste de fase y se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a intervalos de tiempo regulares (24, 48 y 72 h).

Al final del periodo de incubación, se añadió 50 μ l de disolución acuosa de MTT (5 mg/ml) a cada pocillo y se incubó a 37°C durante 4 horas¹⁵. Tras retirar los sobrenadantes, se procedió a disolver los cristales de formazán púrpuras formados en 1 ml de dimetil sulfóxido y se midió la absorbancia con un espectrofotómetro a 570 nm.

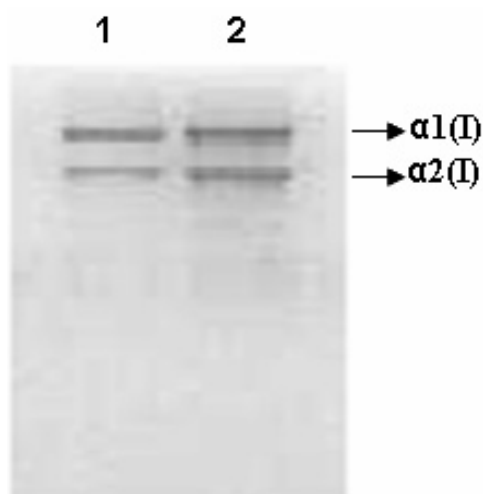
RESULTADOS

Extracción del colágeno

Se determinó, de acuerdo con el índice de hidroxiprolina, que la extractabilidad porcentual del colágeno de la piel de tiburón era aproximadamente de $34 \pm 1\%$ y $52 \pm 1\%$ para ASC y PSC, respectivamente tomando como base el peso seco liofilizado de los tejidos en comparación con su peso húmedo. El patrón SDS – PAGE de ASC y PSC confirmó la presencia de colágeno tipo I con cadenas $\alpha 1$ [I] y $\alpha 2$ [I] características (Figura 1).

FIGURA 1. SDS – PAGE de colágeno tipo I de piel de tiburón. Calle 1: colágeno soluble en ácido y Calle 2: colágeno soluble en pepsina.

FIGURE 1. SDS – PAGE of shark skin type I collagen. Lane 1: acid soluble collagen and Lane 2: pepsin soluble collagen.



Formación de fibrillas

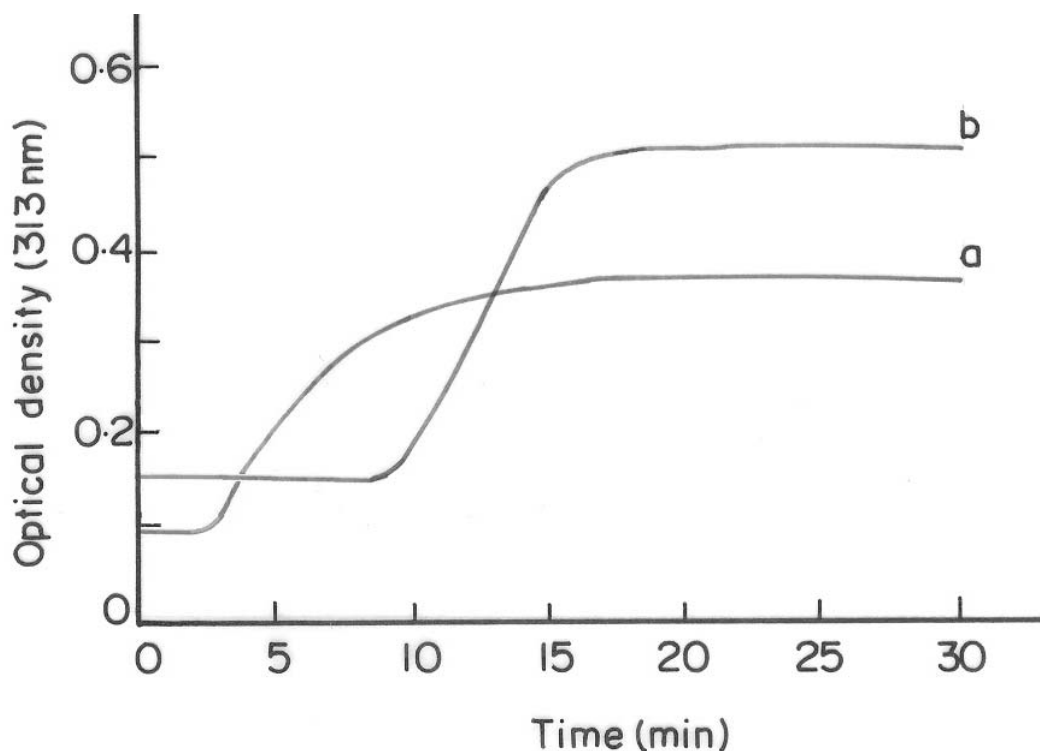
La capacidad del ASC y el PSC de la piel de tiburón para formar fibrillas *in vitro* se evaluó como un aumento de la medida de turbidez a 313 nm. Tanto ASC como PSC fueron capaces de formar fibrillas en las condiciones experimentales dadas. En la Figura 2 se muestran las curvas de turbidez obtenidas. La formación de fibrillas *in vitro* es un proceso de varias fases que incluye la formación de finos y largos filamentos o microfibrillas helicoidales, seguida de la asociación lateral de los finos filamentos para formar fibrillas bandeadas nativas responsables del aumento de turbidez característico¹⁶. En la curva de turbidez se observa claramente que la formación de fibrillas se inició en los 2 primeros minutos de incubación y que el proceso se completó en 20 minutos para ASC. Aunque los extremos no helicoidales, que regulan de forma decisiva la progresión normal de eventos, se eliminan con la pepsina, PSC mostró una curva de turbidez característica (Figura 2) y tardó aproximadamente 10 minutos en iniciar el proceso y 25 minutos en completar la unión de las fibrillas. La temperatura de disolución fue de $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

Fibril formation

The potential of the ASC and PSC of shark skin to form fibrils *in vitro* were evaluated as an increase in turbidity measurement at 313 nm. Both ASC and PSC were able to form fibrils under given experimental condition and the turbidity curves obtained are shown in Figure 2. The fibril formation *in vitro* is a multistep process which involves the formation of long thin filaments or helical micro fibrils followed by the lateral association of the thin filaments to form native banded fibrils responsible for the characteristic turbidity increase¹⁶. From the turbidity curve it is clear that the fibril formation was initiated within 2 min of incubation and the process was completed in 20 min for ASC. Though the non helical ends which critically regulate the normal progression of events is removed by pepsin, the PSC showed a characteristic turbidity curve (Figure 2) and took about 10 min for initiation and the assembly of fibrils completed in 25 min. The dissolution temperature was found to be $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

FIGURA 2. Curvas de turbidez del colágeno de piel de tiburón. a) colágeno soluble en ácido y b) colágeno soluble en pepsina.

FIGURE 2. Turbidity curves of shark skin collagen a) acid soluble collagen and b) pepsin soluble collagen.



Desarrollo de matrices de soporte de colágeno reconstituido

Para un mayor desarrollo y caracterización de la matriz de soporte, se utilizó PSC. La naturaleza inherente del PSC de la piel de tiburón para formar agregados de microfibrillas primarias en los intra e interenlaces cruzados a temperatura y pH óptimos, dando lugar a fibrillas de colágeno más gruesas, se utilizó para generar una membrana o matriz de soporte. Tras el secado, se evaluó la morfología superficial de las matrices de soporte desarrolladas mediante AFM. Las fibrillas completamente formadas se pueden ver como densos grupos de una red interpenetrante (Figura 3). La unión lateral de las fibrillas observada es un rasgo característico del colágeno soluble en pepsina, cuya formación debe estar causada por la interacción entre las regiones helicoidales de las moléculas de colágeno. Del mismo modo, revela que la incorporación del extracto de aloe no alteró la formación de fibrillas de colágeno, como se observó con el patrón similar de la red interpenetrante. La superficie fibrosa de la matriz de soporte desarrollada, observada mediante imagen SEM (Figura 4), muestra una estructura porosa densamente empaquetada, lo que corrobora el hecho de que las fibrillas formaron la red como consecuencia de la estrecha asociación tanto lateral como transversal.

Development of reconstituted collagen scaffolds

For further scaffold development and characterization, PSC was used. The inherent nature of shark skin PSC to form primary micro fibril aggregates through intra and inter crosslinking at optimum pH and temperature, resulting in thicker collagen fibrils, was utilized to fabricate into a membrane or scaffold. After drying, the surface morphology of the developed scaffolds was assessed through AFM. The fully formed fibrils can be seen as dense clumps of interpenetrating network (Figure 3). The lateral assembly of the fibrils seen is a characteristic feature of pepsin-solubilised collagen, which must have formed due to the interaction between helical regions of collagen molecules. It also reveals that the incorporation of aloe extract did not alter the fibrillation of collagen as it showed the similar pattern of the interpenetrating network. The bulk surface property of the developed scaffold observed through SEM image (Figure 4) shows densely packed porous structure adding evidence to the fact that the fibrils formed network due to close association in both lateral and transverse manner.

FIGURA 3. Fotografías obtenidas con el microscopio de fuerza atómica de a) matriz de soporte de colágeno de piel de tiburón soluble en pepsina b) matriz de soporte de colágeno con extracto de aloe incorporado.

FIGURE 3. Atomic force microscope photographs of a) pepsin soluble shark skin collagen scaffold b) aloe extract incorporated collagen scaffold

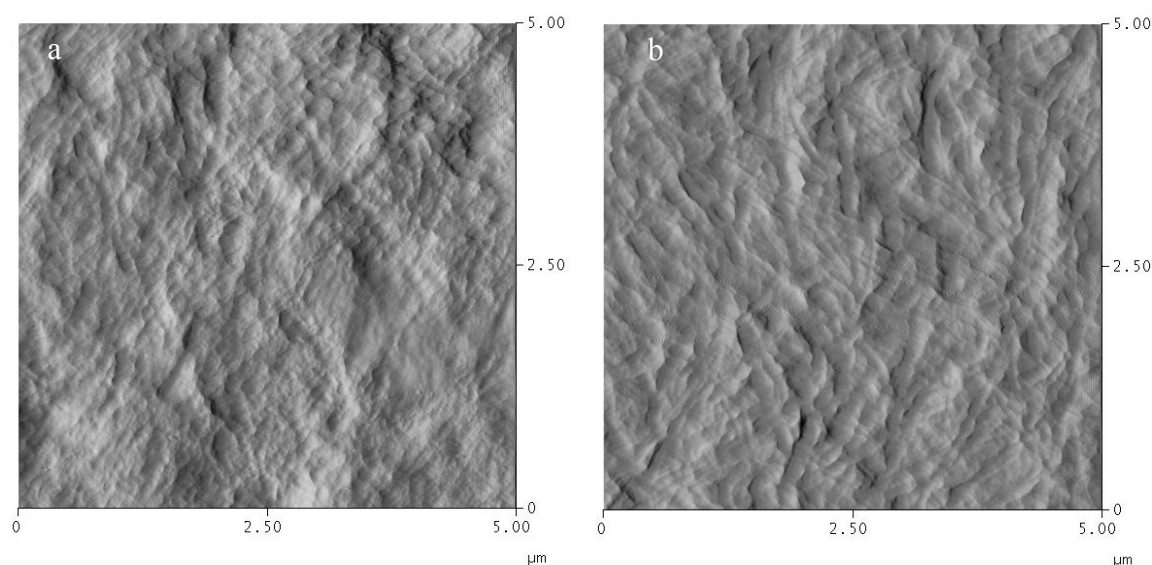
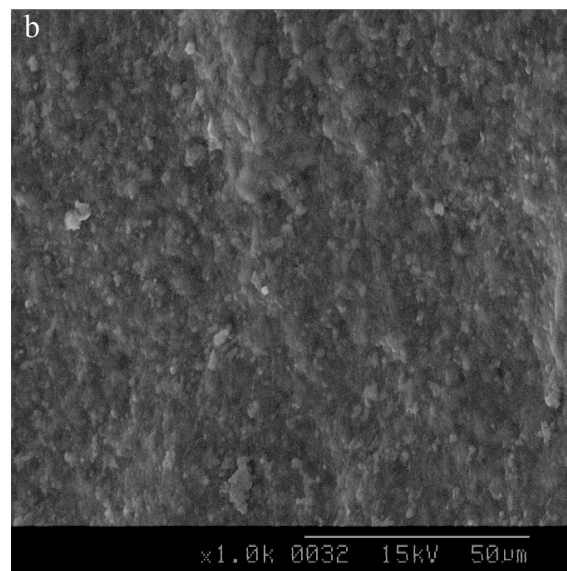
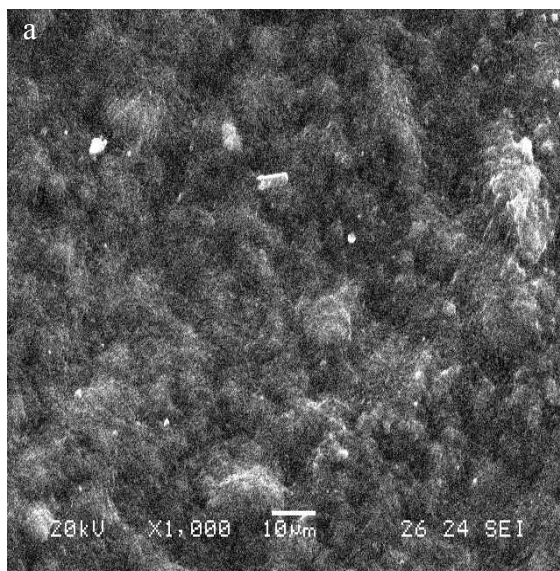


FIGURA 4. Fotografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido de a) matriz de soporte de colágeno de piel de tiburón soluble en pepsina b) matriz de soporte de colágeno con extracto de aloe incorporado.

FIGURE 4. Scanning electron microscope photographs of a) pepsin soluble shark skin collagen scaffold b) aloe extract incorporated collagen scaffold.



Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

El análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) se ha utilizado como herramienta para la investigación estructural del origen vibracional de los enlaces amida y la sensibilidad de la posición del enlace a la conformación. PSC mostró las bandas de absorción características a 1660 y 1550 cm^{-1} , lo que representa las bandas de absorción características de amida I (debido a las vibraciones de tensión de C-O) y amida II (debido a las vibraciones de flexión de N-H y las vibraciones de tensión de C-N), respectivamente. La incorporación del extracto de aloe dio lugar a una pequeña modificación en el espectro, en concreto, al desplazamiento de las bandas amino y carbonilo, y mostró las bandas de absorción características de amida I a 1635-1668 cm^{-1} y de amida II a 1540-1565 cm^{-1} . Los pequeños desplazamientos observados se pueden atribuir a las modificaciones locales que dan lugar a pequeñas variaciones en las frecuencias de rotación y vibración.

Fourier transform infra red spectroscopy (FTIR)

Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis has been used as a tool for structural investigation of the vibrational origin of amide bonds and sensitivity of the bond position to conformation. The PSC displayed the characteristic absorption bands at 1660 and 1550 cm^{-1} , which represents the characteristic amide I (due to C-O stretching vibrations) and amide II (due to N-H bending vibrations and the C-N stretching vibrations) absorption bands respectively. Incorporation of aloe extract led to small modification in the spectrum i.e. shifting of both carbonyl and amino bands and showed the characteristic absorption bands of amide I at 1635 to 1668 cm^{-1} and amide II at 1540 to 1565 cm^{-1} . The small shifts observed can be attributed to local modifications leading to small variations of the rotation and vibration frequencies.

Thermodynamic characteristics of the collagen scaffold

In polymers, heat capacity measurements can be used to measure the changes in thermodyna-

Características termodinámicas de la matriz de soporte de colágeno

En los polímeros, las medidas de capacidad calorífica se pueden utilizar para medir los cambios de funciones termodinámicas asociadas a procesos físicos como la cristalización y la fusión. Se ha utilizado calorimetría diferencial de barrido (DSC) para estudiar los cambios estructurales ocasionados por la desnaturalización y la descomposición, que tienen lugar cuando las redes de colágeno sufren cambios estructurales inducidos térmicamente.

Calorimetría diferencial de barrido

En el colágeno, cada triplete (-Gly-x-y-) de una cadena dada se une a otras dos cadenas próximas mediante dos enlaces de hidrógeno¹⁷. Estos tipos de enlaces intermoleculares son responsables principalmente de la estabilización de la molécula de colágeno. Al producirse la transición térmica, la estructura triple helicoidal cristalina del colágeno se convierte en una espiral aleatoria amorfa. De forma similar en el presente estudio, al someter a la matriz de soporte de colágeno a transición térmica mediante DSC, se alcanzó un pico endotérmico característico a 86°C (Figura 5). La incorporación de análogos de GAG como el extracto de aloe (CA1, CA2 y CA3) influyó enormemente en el comportamiento térmico de las matrices de soporte de colágeno de piel de tiburón. La temperatura de desnaturalización (TD) de las matrices de soporte con aloe incorporado fue aproximadamente de 89,5, 102,6, 92,0°C para CA1, CA2 y CA3, respectivamente. En comparación con PSC (86,0° C), la TD de las matrices de soporte con aloe incorporado se desplazó a una temperatura más alta y CA2 fue la que mostró la temperatura de desnaturalización más alta de todas las matrices de soporte con aloe incorporado.

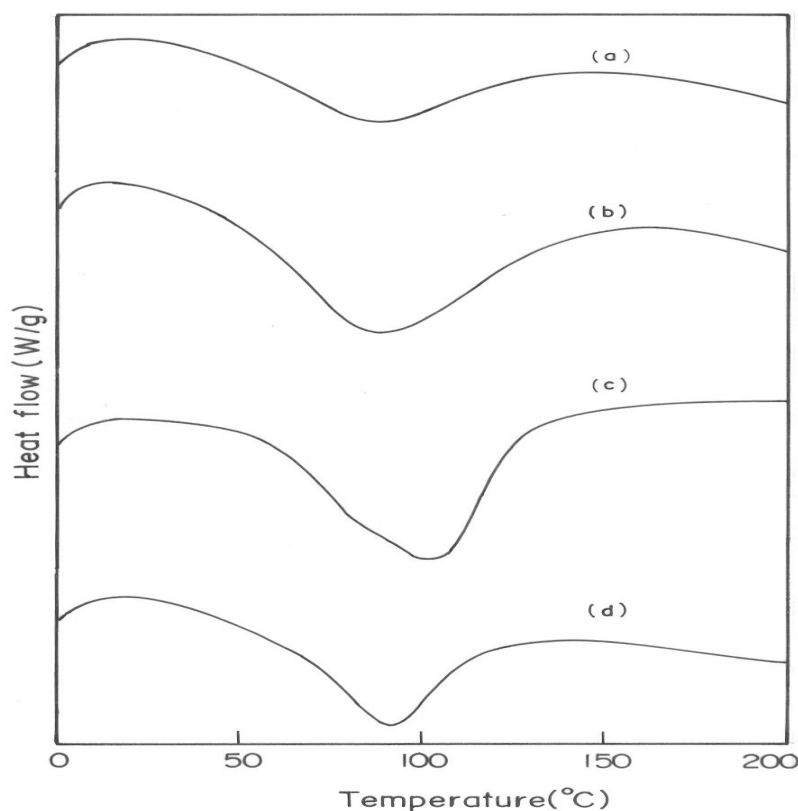
mic functions associated with physical processes such as crystallization and melting. Differential Scanning Calorimetry (DSC) has been used to study the structural changes due to denaturation and decomposition, which occur when collagenous networks undergo thermally induced structural changes.

Differential scanning calorimetry

In collagen, each triplet (-Gly-x-y-) of a given chain is bonded to other two neighboring chains via two hydrogen bonds¹⁷. These types of intermolecular bonding are mostly responsible for stabilizing the collagen molecule. When thermal transition occurs, the crystalline triple helical collagen structure gets converted to an amorphous random coil. Similarly in the current study, collagen scaffold when subjected to thermal transition using DSC exhibited characteristic endothermic peak at 86°C (Figure 5). The incorporation of GAG analogs such as aloe extract (CA1, CA2 and CA3) highly influenced the thermal behavior of the shark skin collagen scaffolds. The denaturation temperature (TD) of aloe incorporated scaffolds showed the TD of about 89.5, 102.6, 92.0°C for CA1, CA2 and CA3 respectively. When compared to PSC (86.0°C), the TD of aloe incorporated scaffolds has been shifted to higher temperature and among the aloe incorporated scaffolds the CA2 exhibited the higher denaturation temperature.

FIGURE 5. Differential scanning calorimetry of aloe incorporated collagen scaffolds (a) pepsin soluble collagen, (b) 10:0.5 (c) 10:1 (d) 10:2

FIGURA 5. Calorimetría diferencial de barrido de las matrices de soporte de colágeno con aloe incorporado (a) colágeno soluble en pepsina, (b) 10:0,5, (c) 10:1, (d) 10:2.



Análisis de resistencia a la tracción

El patrón de elongación con respecto a la tensión aplicada muestra un comportamiento viscoelástico típico. Es evidente que, antes del punto de ruptura, las matrices de soporte mostraron un comportamiento elástico con una relación lineal respecto a la tensión. La máxima resistencia a la tracción fue 28,57 MPa para PSC con un porcentaje de elongación máximo del 26%. La incorporación de aloe mejoró la resistencia a la tracción de las matrices de soporte y el valor máximo se encontró en la proporción 10:1, es decir, CA2.

Viabilidad celular

La capacidad de CA2 para favorecer el crecimiento de las células se evaluó mediante el ensayo de MTT (Figura 6). Las células se esparcieron bien con numerosos fibropodios, indicando una

Tensile strength analysis

The elongation pattern with respect to applied stress shows its typical visco-elastic behavior. It is evident that, before rupture point, the scaffolds exhibited an elastic behavior with a linear relationship to stress. The ultimate tensile strength was 28.57 MPa for PSC with maximum percentage elongation of 26%. The incorporation of aloe enhanced the tensile strength of the scaffolds and the maximum tensile strength was found at the ratio of 10:1 i.e. CA2.

Cell viability

The ability of the CA2 to support cell growth was assessed by MTT assay (Figure 6). The cells were well spread with numerous fibro podia, indicating appropriate cell adhesion to the surface (Figure 7a). The scaffold promoted cell growth and at 48 and 72 h there was a significant en-

adhesión celular adecuada a la superficie (Figura 7a). Las matrices de soporte promovieron el crecimiento de las células y se observó un aumento significativo de la proliferación de células en comparación con los grupos de control a las 48 y 72 horas (Figura 7a). La Figura 7b confirma que las células crecen correctamente en la matriz de soporte con morfología de huso y la Figura 7c muestra la microscopía electrónica de barrido de células en la matriz de soporte.

hancement in the proliferation of cells compared to the control groups (Figure 7a). The Figure 7b confirms that the cells are well grown in the scaffold with spindle morphology and the Figure 7c shows the scanning electron microscopy of cells on the scaffold.

FIGURA 6. Viabilidad de los fibroblastos en CA2 y control mediante ensayo de MTT.

FIGURE 6. Viability of fibroblast on CA2 and control by MTT assay.

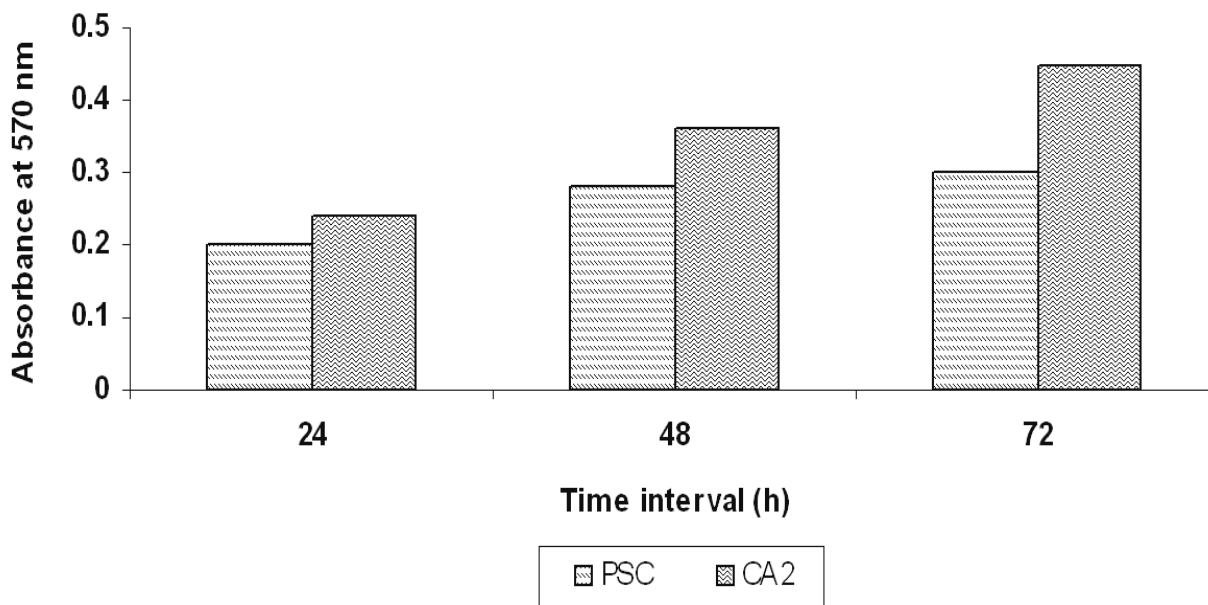
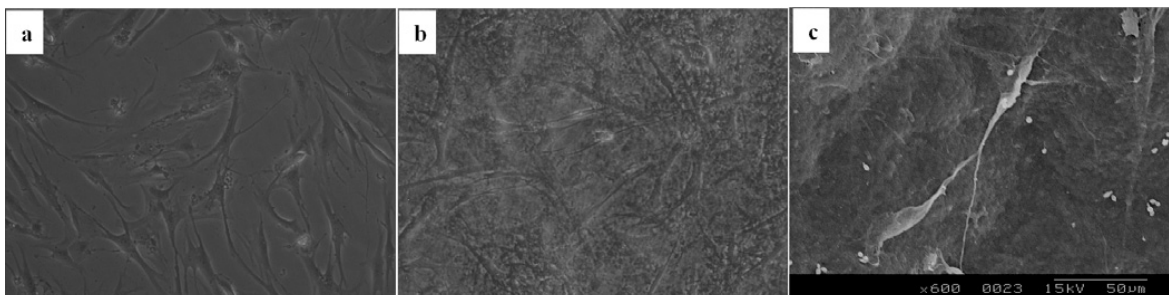


FIGURA 7. Morfología de fibroblastos cultivados sobre CA2 y placa de control tras 72 horas.

- a) Fotomicrografía de fibroblastos control
- b) Fotomicrografía de fibroblastos cultivados sobre CA2
- c) Microscopía electrónica de barrido de fibroblastos cultivados sobre CA2.

FIGURE 7. Morphology of fibroblast cultured over CA2 and control plate for 72h

- a) Photomicrograph of fibroblast control
- b) Photomicrograph of fibroblast cultured over CA2
- c) Scanning electron microscopy of fibroblast cultured over CA2.



DISCUSIÓN

El colágeno tiene una estructura triple helicoidal única, consistente en tres cadenas polipeptídicas que se entrelazan entre sí para formar una microestructura única¹⁸. La unidad estructural básica del tejido colagenoso no es la molécula sola sino una asociación ordenada de moléculas en forma de unión jerárquica de fibrillas. La capacidad inherente de las moléculas para unirse formando agregados *in vitro* permite su manipulación en diversos formatos como matrices de soporte, esponjas, cremas, así como disoluciones líquidas. La matriz de soporte de colágeno ofrece múltiples posibilidades de aplicación en el campo de la investigación de biomateriales, al constituir una herramienta prometedora para las áreas de ingeniería tisular, administración de fármacos y diseño de órganos artificiales. Tanto las propiedades fisicoquímicas como la interacción con la estructura celular varían en función de la fuente de la que se obtiene.

En el presente estudio, se utilizó la piel de tiburón como fuente rica en colágeno tipo I. La piel de tiburón es una fuente fácilmente disponible de colágeno que puede utilizarse como alternativa al colágeno tipo I procedente de la piel bovina o porcina. El colágeno soluble en ácido y el colágeno soluble en pepsina se aislaron de la piel de tiburón y se evaluó la composición de las cadenas mediante SDS – PAGE. Tanto para ASC como para PSC se obtuvieron idénticas bandas en SDS PAGE, con cadenas $\alpha 1$ [I] y $\alpha 2$ [I] características de colágeno tipo I, lo que es una ventaja, ya que el colágeno tipo I se encuentra disponible en estado puro. Sin embargo, en la piel bovina y porcina, está presente, además del colágeno tipo I, el colágeno tipo III. La presencia de colágeno tipo I en la piel de tiburón se confirmó también mediante SDS – PAGE¹⁹. Tomando como base el índice de hidroxiprolina, se determinó que la extractabilidad porcentual de PSC era mayor que la de ASC, siendo los valores aproximados de $54 \pm 1\%$ y $32 \pm 1\%$, respectivamente.

Las curvas de tiempo de absorción e incubación indicativas, por lo general, de la reconstrucción de la matriz de colágeno fueron las curvas sigmoideas típicas con tres fases de reorganización molecular. La primera fase es una fase de latencia sin cambios de absorbancia, correspondiente a la nucleación de las fibrillas de colágeno. La segunda fase es una fase de crecimiento con un

DISCUSSION

Collagen has a unique triple helical structure, consisting of three polypeptide chains intertwined around one another to form unique microstructure¹⁸. The basic structural unit of collagenous tissue is not the molecule alone but an ordered association of molecules in the form of hierarchical assembly of fibrils. The inherent ability of the molecules to assemble into aggregates *in vitro* enables it to be maneuvered into various forms like scaffolds, sponges, creams as well as liquid solutions. The scaffold form of collagen has multifaceted application potential in biomaterials research, as a promising tool for tissue engineering, drug delivery, and artificial organ designing. The physicochemical properties and interaction with cellular structure varies by virtue of the source from which they are obtained.

In this study, shark skin the abundant source of collagen type I was utilized. The shark skin is a readily available source and potential alternative for the Type I collagen from bovine or pig skins. Both acid soluble and pepsin soluble collagen was isolated from the shark skin and the chain composition was assessed by SDS – PAGE. Identical bands were obtained for both ASC and PSC in SDS PAGE, showing characteristic $\alpha 1$ [I] and $\alpha 2$ [I] chains of type I collagen, which is advantageous as type I collagen is available in pure form. But in bovine and porcine skin, type III collagen will also be present along with type I collagen. The presence of type I collagen in the shark skin was also confirmed by SDS – PAGE¹⁹. Based on the hydroxyproline index, the percentage extractability of PSC showed higher value than the ASC, which is about $54 \pm 1\%$ and $32 \pm 1\%$ respectively.

The absorption and incubation time curves indicative of collagen matrix reconstruction ordinarily showed the typical sigmoid curves that had three steps of molecular rearrangement. The first step is a lag phase without absorbance change, corresponding to the nucleation of collagen fibrils. The second step is a growth phase with rapid absorbance change representing the growing cores of fibrils. The third phase is a maturity phase with a constant value of absorbance, including the formation of three dimensional network of fibrils. The self assembly of ASC had a very short lag phase than the PSC which is mainly attributed to the presence of non helical telopeptides in

cambio rápido de absorbancia, lo que representa el crecimiento de los núcleos de las fibrillas. La tercera fase es una fase de maduración con un valor de absorbancia constante e incluye la formación de una red tridimensional de fibrillas. La fase de latencia del autoensamblaje de ASC fue muy corta en comparación con la de PSC, lo que se atribuye principalmente a la presencia de telopéptidos no helicoidales en ASC. Aunque los extremos no helicoidales, que regulan de forma decisiva la progresión normal de eventos, se eliminan en PSC, éste aún mostró una curva de turbidez característica, lo que se atribuye principalmente a las propiedades necesarias para la formación de fibrillas inherentes hasta cierto punto a las interacciones entre los cuerpos helicoidales de las moléculas de colágeno. En la piel bovina o porcina, las fracciones solubles en pepsina tienen una fase de latencia prolongada y el agregado final o la turbidez es menor que en la fracción soluble en ácido¹⁶. Esto es debido a la presencia de colágeno tipo III junto con colágeno tipo I en el extracto soluble en pepsina, lo que da lugar a la formación de fibrillas más delgadas. PSC también se beneficia de la eliminación de los determinantes antigénicos P situados en los extremos no helicoidales, lo que, por otra parte, provoca una respuesta inmune más moderada²⁰. Por esta razón, el PSC de la piel de tiburón se utilizó para un posterior desarrollo y caracterización de la matriz de soporte.

La capacidad del colágeno para servir como biomaterial se debe en gran medida al hecho de que es un material natural de inmunogenicidad baja. Su capacidad inherente para formar fibras y grupos de fibras se utilizó para desarrollarlo como una matriz de soporte. Se ha establecido en otros estudios que el colágeno de piel de tiburón varía con respecto al de los mamíferos por su bajo contenido en iminoácidos y sus enlaces cruzados, que influyen enormemente en las propiedades fisicoquímicas del colágeno. La baja temperatura de desnaturalización del colágeno de la piel de los peces ya se ha establecido en otros estudios^{19, 21}. Por esta razón y con objeto de mejorar las propiedades fisicoquímicas de las matrices de soporte de piel de tiburón, se intentó reforzar la molécula de colágeno con análogos de GAG como el extracto de aloe de origen vegetal. Se ha probado que el extracto de aloe posee potenciales agentes para la curación de heridas y que el principal componente del extracto de

ASC. Though the non helical ends which critically regulate the normal progression of events is removed in PSC, it still showed a characteristic turbidity curve which is mainly attributed to the properties necessary for fibril formation inherent to a certain extent in interactions between the helical bodies of collagen molecules. In bovine or porcine skin, the pepsin soluble fractions have prolonged lag phase and the final aggregate or the turbidity is less than acid soluble fraction¹⁶. This is due to type III collagen present along with type I collagen in pepsin extract which forms thinner fibrils. The PSC also benefits from the removal of the antigenic P-determinants located in the non helical ends which otherwise provokes milder immune response²⁰. Hence shark skin PSC was used for further scaffold development and characterization.

The ability of collagen to serve as a biomaterial rests largely on the fact that it is a natural material of low immunogenicity. Its inherent ability to form fiber and fiber bundles was utilized to develop collagen as a scaffold. It has been reported that the collagen from shark skin varies from the mammals in its low imino acid contents and cross linkages which highly influence the physicochemical properties of the collagen. The low denaturation temperature of fish skin collagens is already reported^{19, 21}. Hence to enhance the physicochemical properties of the shark skin scaffolds an attempt was made to reinforce the collagen molecule with the GAG analogs such as aloe extract of plant origin. Aloe extract has been proved to confirm potential wound healing agents and the major constituent of the aloe extract is polysaccharides mainly the acetylated mannan. Incorporation of aloe extract to collagen during fibril formation has not altered the fibrillation and a thin scaffold could be fabricated.

Recent developments in AFM technique yielded high-resolution images providing significant information on the fibrillar assembly and ultra structure of collagen fibrils. 'D' periodicity of 67 nm and a width of 40 nm in collagen fibrils are characteristic features of pepsin-solubilized collagen. However the incorporation of aloe has an impact on the surface morphology as it has modified the surface morphology compared to the pepsin soluble collagen. This may be attributed to the interaction of collagen molecules with the components of aloe extract.

aloe son los polisacáridos y, principalmente, el manano acetilado. La incorporación de extracto de aloe al colágeno durante la formación de fibrillas no alteró dicho proceso y pudo generarse una fina matriz de soporte.

Recientes desarrollos en la técnica AFM han permitido la obtención de imágenes de alta resolución, proporcionando información significativa sobre la unión fibrilar y la ultraestructura de las fibrillas de colágeno. Son rasgos característicos de las fibrillas de colágeno soluble en pepsina una periodicidad 'D' de 67 nm y un ancho de 40 nm. Sin embargo, la incorporación de aloe afecta a la morfología superficial en el sentido de que la modifica en comparación con el colágeno soluble en pepsina. Esto puede atribuirse a la interacción de las moléculas de colágeno con los componentes del extracto de aloe.

PSC mostró una absorción característica en FTIR y la incorporación de aloe dio lugar a una pequeña modificación en el espectro, en concreto, el desplazamiento de las bandas amino y carbonilo, y mostró las bandas de absorción características de amida I a 1635-1668 cm^{-1} y de amida II a 1540-1565 cm^{-1} . Los pequeños desplazamientos observados se pueden atribuir sencillamente a las modificaciones locales que dan lugar a pequeñas variaciones en las frecuencias de rotación y vibración.

La reorganización del colágeno a pH neutro permite a las fibrillas individuales alinearse como grupos de fibrillas estrechamente empaquetados. Esto da lugar a la formación de un ensamblaje macromolecular estrechamente asociado, cuya propiedad de superficie fibrosa se asemeja a una fina película. Estas moléculas de colágeno incrustadas dentro de la red de fibras son considerablemente más estables que las mismas moléculas en disolución y cuando se convierten en películas/matrices de soporte sin iniciar la formación de fibrillas²². La estabilidad térmica observada es debida a los enlaces de hidrógeno intermoleculares y a la presencia de iminoácidos y, principalmente, de hidroxiprolina. La matriz de soporte de colágeno soluble en pepsina muestra una Td de 86°C y la incorporación de análogos de GAG como el aloe influye enormemente en el comportamiento térmico de las matrices de soporte de colágeno de piel de tiburón. Aunque la Td aumenta con la incorporación de aloe, la proporción 10:1 muestra una Td más alta que otras, lo que se atribuye al completo refuerzo de

The PSC displayed the characteristic absorption in FTIR and incorporation of aloe led to small modification in the spectrum i.e. shifting of both carbonyl and amino bands and showed the characteristic absorption bands of amide I at 1635 to 1668 cm^{-1} and amide II at 1540 to 1565 cm^{-1} . The small shifts observed can be simply attributed to local modifications leading to small variations of the rotation and vibration frequencies.

The reordering of collagen at neutral pH enables the individual fibrils to align as closely packed fibril bundles. This results in formation of closely associated macromolecular assembly, whose bulk property resembles a thin film. These collagen molecules embedded within the lattice of fiber are substantially more stable than the same molecules in solution and also when made into films/ scaffolds without initiating fibrillation²². Thermal stability observed is due to intermolecular hydrogen bonds and presence of imino acids, mainly hydroxyproline. The pepsin soluble collagen scaffold exhibits Td of 86°C and the incorporation of GAG analogs such as aloe highly influences the thermal behavior of the shark skin collagen scaffolds. Though the Td is shifted to higher temperature upon incorporation of aloe, the ratio 10:1 shows higher Td than others, which is attributed to the complete reinforcement of the collagen triple helical structure with the constituent of aloe extract such as polysaccharides and impart the mechanical stability.

The scaffold prepared was found to have high tensile strength. Due to relatively small size of individual fibers and existence of intra and intermolecular cross links aligned in the form of network provided high mechanical strength with respect to the applied tensile force. The study well correlated with the thermodynamic properties of the developed scaffolds that the ratio 10:1 displayed the maximum mechanical strength.

It is imperative to investigate the biocompatibility of developed scaffold before utilizing it for further application. The importance of ECM for maintenance of cell shape, proliferation and differentiation is widely appreciated^{23, 24}. The viscoelastic nature of reconstituted collagen scaffold suggests that it would possess enough tensile strength to withstand the transfer of dermal cells and can be used as a good substratum for fibroblast culture. The maintenance of the fibril

la estructura triple helicoidal del colágeno con los componentes del extracto de aloe como los polisacáridos, confiriéndole estabilidad mecánica.

La matriz de soporte preparada demostró tener una alta resistencia a la tracción. Debido al tamaño relativamente pequeño de las fibras y la existencia de enlaces cruzados intra e intermoleculares alineados en forma de red, se obtuvo una resistencia mecánica alta con respecto a la fuerza de tracción aplicada. El estudio correlaciona satisfactoriamente las propiedades termodinámicas de las matrices de soporte desarrolladas con el hecho de que la proporción 10:1 mostrara la máxima resistencia mecánica.

Se hace necesario investigar la biocompatibilidad de la matriz de soporte desarrollada antes de su uso para aplicaciones posteriores. La importancia de la MEC para el mantenimiento de la forma, proliferación y diferenciación celulares se reconoce ampliamente^{23, 24}. La naturaleza viscoelástica de la matriz de colágeno reconstituido sugiere que tendría suficiente resistencia a la tracción para soportar la transferencia de células dérmicas y puede utilizarse como un buen sustrato para el cultivo de fibroblastos. El mantenimiento de la estructura de fibrillas de la matriz de soporte de colágeno induce la infiltración y proliferación celulares. Sustitutos de la piel desarrollados recientemente mediante ingeniería tisular contienen colágeno como componente integral de la arquitectura de soporte²⁵. Además, el colágeno reconstituido, una vez retirada la región telopeptídica, no puede inducir ninguna reacción inmunológica. Se observó *in vitro* que los fibroblastos conservaban la orientación organizada en forma de huso al cultivarse sobre la matriz de soporte de colágeno. Por tanto, la matriz de soporte de colágeno con extracto de aloe incorporado en una proporción 10:1 actúa como un material biocompatible con una resistencia a la tracción considerable.

La investigación anterior sugiere que la matriz de soporte de colágeno de piel de tiburón desarrollada puede ser una alternativa efectiva al colágeno de mamífero en el campo de la ingeniería tisular y para diversas aplicaciones en la curación de heridas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su más sincero agradecimiento al Dr. A.B. Mandal, Director,

structure in collagen scaffold induces cellular infiltration and proliferation. Recently developed tissue-engineered skin substitutes contain collagen as an integral component of the scaffolding architecture²⁵. Apart from that collagen reconstituted after removal of the telopeptide region may not induce any immunological reactions. It was observed *in vitro* that the fibroblasts retained the spindle shape, organized orientation when cultured over collagen scaffold. Hence the developed collagen scaffold incorporated with aloe extract at 10:1 ratio acts as a biocompatible material with appreciable tensile strength.

The above investigation suggests that the developed shark skin collagen scaffold could be an effective alternative for the mammalian collagen for tissue engineering and various wound healing applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to express their sincere thanks to Dr. A.B. Mandal, Director, CLRI for giving us the opportunity and encouragement to carry out the work.

CLRI por brindarles la oportunidad y animarles a llevar a cabo el estudio.

BIBLIOGRAFÍA/ BIBLIOGRAPHY

1. Rao KP. Recent developments of collagen-based materials for medical applications and drug delivery systems. *J Biomater Sci Polym Ed* 1995;7: 23-645.
2. Berglund JD, Mohseni MM, Nerem RM, Sambanis A. A biological hybrid model for collagen based tissue engineered vascular constructs. *Biomaterials* 2003;24:1241-1254.
3. Sionkowska A, Wess T. Mechanical properties of UV irradiated rat tail tendon collagen. *Int J Biol Macromol* 2004;34:9-12.
4. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens-structure, function and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:1531-1546.
5. Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm* 2001;221:1-22.
6. Kimura S, Kamimura T, Takema Y, Kubota M. Lower vertebrate collagen evidence for Type I – like collagen in the skin of lamprey and shark. *Biochim Biophys Acta* 1981;669:251-257.
7. Saliba MJ. Heparin in the treatment of burns: a review. *Burns* 2001;27:349-358.
8. Freyman TM, Yannas IV, Gibson LJ. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *Prog Mater Sci* 2001;46:273-282.
9. Davis RH, Donato JJ, Hartman GM, Haas RC. Anti-inflammatory and wound healing activity of a growth substance in Aloe vera. *J Am Podiatr Med Assoc* 1994;84:77-81.
10. Grey V, Rouyer-Fessard C, Gammeltoft S. Insulin like growth factor ii/mannose- 6-phosphate receptors are transiently increased in the rat distal intestinal epithelium after resection. *Mol Cell Endocrinol* 1991;75:221-227.
11. Nagai T, Yamashita E, Taniguchi K, Kanamori N, Suzuki N. Isolation and characterisation of collagen from the outer skin waste material of cuttlefish (*Sepia lycidas*). *Food Chem* 2001;72:425-429.
12. Woessner JF. Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 1961;93:440-447.
13. Williams BR, Gelman RA, Poppke DC, Piez KA. Collagen fibril formation. *J Biol Chem* 1978;253:6578-6585.
14. Dische Z. Color reactions of carbohydrates. In: Whistler RL, Wolfrom ML, editors. *General color reactions: methods in carbohydrate chemistry*. New York:Academic Press; 1962. 478-481.
15. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
16. Gelman RA, Williams BR, Piez KA. Collagen fibril formation: evidence for multistep process. *J Biol Chem* 1979;254:180-186.
17. Ramachandran GN, Kartha G. Structure of collagen. *Nature* 1954;174:269-270.
18. Harkness RD. Collagen. *Sci Prog* 1966;54:257-274.
19. Nomura Y, Yamano M, Shirai K. Renaturation of alpha 1 chains from shark skin collagen Type I. *J Food Sci* 1995;60:1233-1236.
20. Knapp TR., Luck E, Daniels JR. Behavior of solubilised collagen as a biopiant. *J Surg Res* 1977;23:96-105.
21. Nomura Y, Toki S, Ishii Y, Shirai K. The physico chemical property of shark Type I collagen gel and membrane. *J Agri Food Chem* 2000;48:2028-2032.
22. Tiktopulo EE, Kajava AV. Denaturation of Type I collagen fibrils is an endothermic process accompanied by a noticeable change in the partial heat capacity. *Biochemistry* 1998;37:8147-8152.
23. Aumailley M, Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* 1998;76:253-265.
24. Friedl P, Zanker KS, Bocker EB. Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions and integrin function. *Microsc Res Tech* 1998;43:369-378.
25. Bello YM, Falabella AF, Eaglstein WH. Tissue-engineered skin. Current status in wound healing. *Am J Clin Dermatol* 2001;2:305-313.